

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590153

研究課題名(和文) p57KIP2による脂溶性ビタミンの生理活性制御機構の解明と応用研究

研究課題名(英文) Analysis of p57KIP2's physiological role dependent on fat vitamins

研究代表者

高橋 勝彦 (Takahashi, Katsuhiko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80307066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期制御分子として見出されたp57Kip2は、その欠損動物が胎生期の骨形成の未発達を呈したことから、個体形成時の骨器官に作用する生理活性物質の活性を支える分子である事が示唆されてきた。今回申請者は、p57Kip2が骨形成に必須のビタミンD3の作用点であるビタミンD受容体(VDR)に結合することでVDRの転写因子活性を支持する事を見出した。またp57遺伝子欠損マウスは胎盤細胞の過増殖を示したことから、p57の胎盤機能維持への機能を考えた。今回の研究から、申請者はp57が胎盤形成時にみられる胎盤細胞同士の融合に関わる膜性糖タンパク質ASCT2の発現量や細胞内挙動に影響する事を見出した。

研究成果の概要(英文)：A CDK inhibitor, p57Kip2, might be one of the molecules for osteogenesis, because p57-ablated mice displayed delay of bone formation. So, we assumed that p57 could regulate the bioactivities of the certain vitamins or hormones for bone formation. Here we have found out that p57 bound VDR, vitamin D3 receptor, and was necessary for VDR's activity, which is the transcription factor. And p57 KO mice also displayed placentalomegaly with trophoblastic dysplasia. p57 affected on the expression levels and cellular localization of ASCT2, which acts for the cell fusion in trophoblast-differentiation. Now we are examining the mechanism of the p57's activity on ASCT2 on placentalomegaly.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：脂溶性ビタミン 骨代謝 胎盤 細胞周期 アミノ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1) p57^{KIP2} は、CDK (サイクリン依存性キナーゼ) インヒビターとして見出されたことからサイクリン-CDK 複合体に結合して CDK のタンパク質リン酸化活性を抑制することで細胞周期進行の制御を担う分子の一つと考えられてきた。癌抑制遺伝子産物と考えられ、各種癌組織における p57^{KIP2} 発現の減少や変異体の発現が見出されている。p57^{KIP2} 遺伝子はヒトではゲノムインプリンティングによる発現制御を受ける領域である染色体 11 番 p15.5 に存在し、通常は父性遺伝の染色体からのみ発現する。この領域の変性は、遺伝性疾患である Beckwith-Wiedemann 症の発症に關与する。これまで申請者は、p57^{KIP2} 遺伝子欠損マウスを樹立しその表現型を報告した。p57^{KIP2} 遺伝子欠損マウスは個体発生期の胎盤形成異常、骨代謝異常、腎臓、中枢神経系の形成不全などを呈し、その殆ど (95%以上) が生後 24 時間以内に死亡した。本遺伝子欠損マウスは、典型的な胎児発育不全モデル動物である。また、成長した欠損体も、各種臓器の発達遅延を呈した。申請者らのこれまでの成果から、胎盤における p57^{KIP2} の役割についてマウスの知見を基にヒト絨毛性疾患の病理的診断法として p57^{KIP2} の特異的抗体による免疫病理解析が確立された。p57^{KIP2} は分子内に特徴的なプロリン繰り返し領域を含んでおりサイクリン-CDK 複合体のみならず多種のタンパク質との複合体形成をする。実際、p57^{KIP2} は各種転写因子に結合して転写反応を制御し様々な遺伝子の発現調節に關与する事が報告されてきた。p57^{KIP2} と結合する分子としてサイクリン-CDK 複合体の他に、筋肉細胞の分化に關与する MyoD、癌遺伝子産物である B-Myb、またドパミン作動

性神経細胞の発達に關与するオーファン核内受容体である Nurr1 との結合がこれまで報告された。p57^{KIP2} 遺伝子欠損マウスの発生時に認められる異常は CDK 活性変化に加えて p57^{KIP2} が欠損したことで生じる各種転写因子の制御異常に基づく事が考えられた。

申請者は p57^{KIP2} 遺伝子欠損マウスが呈する骨形成不全に着目し、骨芽細胞の石灰化に關わるビタミン D 受容体 (VDR) が p57^{KIP2} と結合することを、各種発現プラスミドを用いた導入実験から見出した。さらに、申請者の所属研究室が精力的にビタミン A 代謝物の生理的・薬理的作用機序の解明に取り組んでいたことから、各種細胞分化モデルを用いた検討から特異的受容体である RAR や RXR と p57^{KIP2} との相互作用の存在を示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

上記の背景から申請者は、微量栄養素である脂溶性ビタミン、特に核内に特異的受容体を持つビタミン A とビタミン D の生理活性発現に特異的核内受容体と p57^{KIP2} との結合あるいは複合体形成が生理的に關与するメカニズムの存在を考え、その解明を目指した。脂溶性ビタミンの受容体以外の既知の核内受容体と p57^{KIP2} との結合の可能性をも探っていきたい。申請者は、p57^{KIP2} による特定の核内受容体の転写活性調節が妊娠時の母体が摂取する微量栄養素の生理活性作用発現の要であると考えた。少子化が社会問題となっている昨今、産科研究は本邦の将来を支えていく上で最も発展の求められる分野の一つであり、胎盤機能を支える分子 p57^{KIP2} について、新規の生理的作用機序の解明を進めることは、p57^{KIP2} の欠損や機能不全を伴う胎生期の各種ヒト疾患の

予防法や治療ターゲットの基盤構築に繋がるものと期待された。

3. 研究の方法

(1) p57^{KIP2}の骨形成に及ぼす影響に関する検討

星薬科大学実験動物施設の SPF 管理区域にて p57^{KIP2} 遺伝子欠損マウスを維持してきた。野生型及び p57^{KIP2} 欠損マウスの新生児の頭蓋骨から調製した初代培養骨芽細胞を用いた。遺伝型の確認は細胞の調整後となるため、p57+/- (heterozygote) 同士の交配から得られた新生児を個体毎に細胞調整を速やかに進め、遺伝型確認の後に野生型と遺伝子欠損型とを実験に用いた。解析方法として、脂溶性ビタミン核内受容体のうちビタミン D3 に対する受容体 VDR を特異的抗体を用いたイムノプロット法で検出を試み、比較検討した。

骨芽細胞における生理的な p57^{KIP2} と VDR との結合の存在を明らかにするため、p57^{KIP2} や VDR に対する特異的抗体を用いた免疫沈降法で p57^{KIP2} と VDR との複合体形成を調べた。

(2) p57^{KIP2}の胎盤形成に及ぼす影響に関する検討

ヒト胎盤組織由来のがんである絨毛がんの細胞株・BeWo は、フォルスコリン処理によりヒト胎盤形成時にみられる合胞化（シンシチオ化）とそれに引き続き生じる絨毛性ゴナドトロピン（hCG）の産生を示すことから、国内外にて広く胎盤分化モデル細胞として用いられている。申請者は、BeWo 細胞の p57^{KIP2} 遺伝子導入株を作成し、p57^{KIP2} 発現による影響から胎盤形成への p57^{KIP2} の役割を探る事とした。

まず脂溶性ビタミン核内受容体としてピタ

ミン A（レチノイド）に対する受容体 RXR、ビタミン D3 に対する受容体 VDR について、それぞれの特異的抗体を用いたイムノプロット法で検出を試みた。次に、p57^{KIP2} と VDR との複合体形成を免疫沈降法で検討した。

BeWo 細胞のシンシチオ化（胎盤細胞分化）に対する p57^{KIP2} の役割を明らかにするため、フォルスコリン処理を行なった BeWo 細胞及び p57^{KIP2} 導入細胞を定法に従い細胞表面タンパク質であるデスモブラキンを特異的抗体で免疫的蛍光標識にて検出し、同時に DAPI で核を標識したものを蛍光顕微鏡観察を行なった。細胞個々がデスモブラキンを囲まれた写真像となる。合胞化の進行により囲みに複数の核が観察されることで合胞化の進行の程度を評価した。

胎盤のシンシチオ化では隣接細胞同士の融合に二種類の膜タンパク質、シンシチン及びその受容体である ASCT2 との結合が認められる。フォルスコリン処理を施した BeWo 細胞及び p57^{KIP2} 導入細胞について、これらの分子の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR 法で検出した。また ASCT2 のタンパク質検出を、特異的抗体を用いたイムノプロット法及び免疫的蛍光標識による顕微鏡観察で行なった。

4. 研究成果

(1) p57^{KIP2}の骨形成に及ぼす影響に関する検討

p57^{KIP2} が生理的な VDR の発現レベルに及ぼす影響を、イムノプロット法で検討した。マウス新生児から調製した初代骨芽細胞における VDR の発現レベルを、野生型 (WT) と p57^{KIP2} 欠損型 (p57^{-/-}) で比較検討を試みた結果、WT に比べて p57^{-/-} では VDR レベルが有意に減少していた (図 1)。

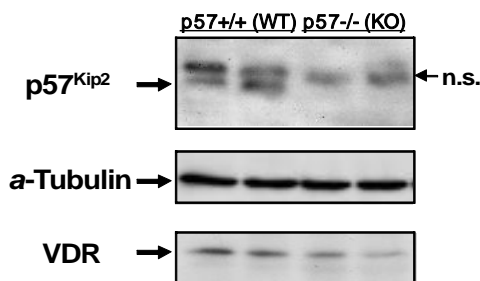


図1 マウス骨芽細胞で、p57^{KIP2}欠損はVDR発現レベルを下げた。

WT の骨芽細胞について活性型ビタミン D₃ (VD₃) 処理を行ない、そのライセートについて抗 VDR 抗体で免疫沈降を行ない、抗 p57^{KIP2} 抗体で検出を試みた。図2に示す様にVD₃ 処理した細胞で特異的に p57^{KIP2} が検出された。

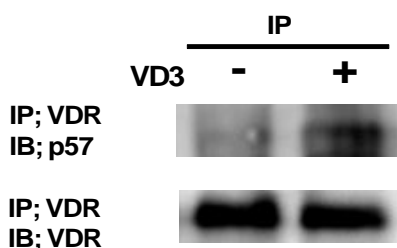


図2 マウス骨芽細胞で、p57^{KIP2}とVDRと結合は、ビタミンD₃ (VD₃)で亢進した。

骨芽細胞における p57^{KIP2} と VDR との複合体形成が VD₃ 依存的に進むことが明らかとなった。p57^{KIP2} 遺伝子欠損マウスに認められた骨形成異常は、VDR の発現レベルの低下と p57^{KIP2} による VDR 活性制御機構が欠落したことによるものと考えられた。

(2) p57^{KIP2} の胎盤形成に及ぼす影響に関する検討

ヒト胎盤組織由来のがんである絨毛がんの細胞株・BeWo は、胎盤分化モデルとして汎用されている。p57^{KIP2} 欠損マウスの胎盤における異常を背景に、細胞レベルでの検討を進めるための材料として本細胞株とその p57^{KIP2} 発現誘導株とを用いて比較検討を進めた。まず、

脂溶性ビタミンの受容体のうち、ビタミン A (レチノイド) の受容体である RXR、ビタミン D の受容体である VDR をイムノプロット法で解析した。その結果、BeWo 細胞に比べて p57 発現細胞では RXR, VDR 共に増加を示した。抗 VDR 抗体で免疫沈降法を行ない、抗 p57^{KIP2} 抗体によるイムノプロット法検出を試みたが、p57^{KIP2} の特異的な検出は認められず、複合体形成は胎盤細胞株では起きないことが示唆された。

BeWo 細胞が、胎盤機能の形成時に生理的にみられる合胞化のモデルであることを用いて、定法に従いフォルスコリン添加による分化誘導を行なった。p57^{KIP2} 発現細胞ではフォルスコリン未処理でも合胞化が進んでいた(図3)。

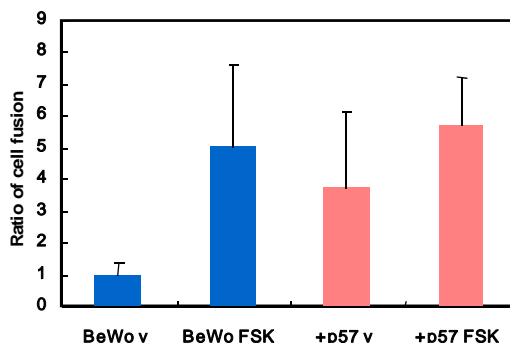
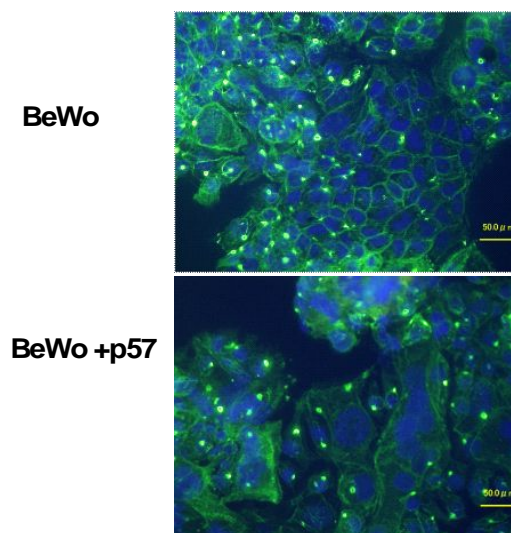
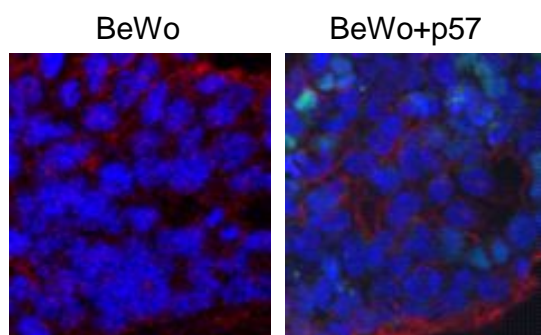


図3 p57発現はBeWo細胞の合胞化を促進した。

そこで、合胞化の実行分子であるシンシチンとその受容体である ASCT2 に対する p57^{KIP2} の影響に着目した。まずこれらの遺伝子発現レベルを BeWo 細胞と p57^{KIP2} 発現細胞について比較検討した。シンシチンの遺伝子発現レベルは p57^{KIP2} の発現により増加した。ASCT2 遺伝子発現レベルは p57^{KIP2} による影響を受けなかった。p57^{KIP2} 発現による合胞化の促進はシンシチン発現量の亢進であることが示唆された。また、フォルスコリン処理 24 時間後で BeWo 細胞では ASCT2 遺伝子発現が減少したが、p57^{KIP2} 発現細胞では時間経過による変化は認められなかった。p57^{KIP2} による ASCT2 の発現亢進の維持機構の存在が示唆された。



Red; ASCT2
Blue; Nuclear (DAPI stain)

図4 BeWo細胞ではp57発現により個々の細胞の表面へのASCT2局在化が促された。

ASCT2 は、元来アミノ酸トランスポーターとして機能する糖タンパク質である。その局在性が外部刺激に応じて変化する可能性を考え、ASCT2 の特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を行ない共焦点顕微鏡観察を行なった。BeWo 細胞における ASCT2 は細胞集団の表面に強く検出されたもののデスモブラキンのように個々の細胞の周囲での検出はされなかったが、フォルスコリン処理 (30 分後) 細胞では細胞周囲にそのシグナルを観察することができた。p57^{KIP2} 発現細胞ではフォルスコリン

未処理の細胞でも個々の細胞周囲に ASCT2 の検出を認めた (図 4)。胎盤形成における p57^{KIP2} 発現は、胎盤機能を担う合胞化細胞の成立を支えることがこれらの結果から強く示唆された。

ASCT2 には、シンシチンの受容体とアミノ酸輸送体の二つの機能が知られている。胎盤形成において ASCT2 はこれら両方の機能を担っているかはこれまで報告がない。ASCT2 の機能のスイッチングを p57^{KIP2} が担っている可能性を考えた。申請者は、二つの機能を有する ASCT2 が胎盤形成に果たす意義に大変興味を持っており、計画期間内に明らかに出来なかった事は大変無念である。本期間内に見出した p57^{KIP2} に基づくシンシチンや ASCT2 の発現量制御の現象について、それらの機序に繋がる知見を早々に見出し、細胞周期制御とは異なる p57^{KIP2} の生理的意義と機能不全がもたらす病態への予防法・治療法の提案を目指していく所存である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

C. Sagara, K. Takahashi, H. Kagechika, and N. Takahashi, Molecular mechanism of 9-cis-retinoic acid inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2013) Vol.433, 102-107. 査読有

K. Shimazaki, T. Uchida, A. Komine, and K. Takahashi, p53 retards cell-growth and suppresses etoposide-induced apoptosis in Pin1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012) Vol.422, 133-138. 査読有

N. Takahashi, T. Ohba, M. Imai, Y. Sasaki, T. Kumaoka, K. Takahashi, and Y. Fujiu, Covalent binding of retinoic acid to cytokeratins 16 and 10 accompanies its action in mouse skin tissues. FASEB J. (2011) Vol.25, 951-955. 査読有

A. Sasaki, K. Takahashi, G. Yamamoto, Y. Tsunoda, T. Abe, and T. Tachikawa, Rab3a and Rab27b Expression in Nonfunctioning Pituitary Adenomas, (2011) Showa Univ. J. Med. Sci., Vol.22, 183-192. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

高橋勝彦 他

アミノ酸輸送体 Asct2 を標的とした脂肪蓄積抑制効果の検討

平成 25 年度 学術研究振興資金 研究成果報告会 2014 年 2 月 17 日、東京

高橋勝彦 他

p53 による Pin1 欠損細胞の増殖・細胞死制御の検討

日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 28 - 30 日、横浜

高橋勝彦 他

レチノイン酸作用機序に基づく抗肥満ターゲットとしてのアミノ酸トランスポーター・ASCT2 の可能性

平成 24 年度 学術研究振興資金 研究成果報告会 2013 年 2 月 28 日、東京

高橋勝彦 他

レチノイド受容体 RXR への p57^{Kip2} の関与の検討

オープンリサーチセンター整備事業研究成果報告会 2012 年 2 月 23 日、東京

高橋 勝彦

p53-Pin1 ネットワークの生理的意義とエネルギー代謝への関与の可能性

東北大学農学部 第三回タンパク質研究会
2012 年 6 月 5 日、仙台

高橋勝彦 他

胎盤栄養膜細胞におけるレチノイン酸依存的 PKA 活性化の解析

オープンリサーチセンター整備事業研究成果中

間報告会 2011 年 2 月 24 日、東京

Katsuhiko Takahashi 他

Involvement of p57^{KIP2} in hydrophobic vitamin receptor of human choriocarcinoma BeWo cells

第 84 回日本生化学会 2011 年 9 月 20 日 - 24 日、京都

高橋勝彦 他

成熟脂肪細胞に与えるレチノイドの影響

日本レチノイド研究会、第 22 回学術集会、2011 年 11 月 11 日 - 12 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勝彦 (TAKAHASHI Katsuhiko)
星薬科大学・医薬品化学研究所・准教授
研究者番号：80307066

(2) 研究分担者

今井 正彦 (IMAI Masahiko)
星薬科大学・医薬品化学研究所・助教
研究者番号：40507670

高橋 典子 (TAKAHASHI Noriko)
星薬科大学・医薬品化学研究所・教授
研究者番号：50277696

(3) 連携研究者

天野 均 (AMANO Hitoshi)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号：90212571